



Universidad de Oviedo
La Universidad de Asturias



SERVICIO DE SALUD
DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

Hospital Universitario
Central de Asturias

Identificación de las proteínas virales producidas en células infectadas por bocavirus humano

Sección de Virología-Servicio de Microbiología
Hospital Universitario Central de Asturias

Máster en Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud por la
Universidad de Oviedo

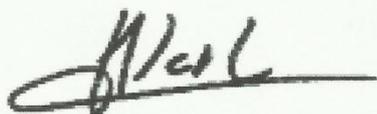
Alberto José Ablanedo Gayol
Junio-2013

JOSE ANTONIO BOGA RIVEIRO, investigador contratado del SNS adscrito al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias, y FRANCISCO PARRA FERNANDEZ, catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de fin de master ha sido realizado por Alberto José Ablanedo Gayol bajo su dirección en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias.

Para que surta los efectos oportunos, en Oviedo a 5 de Junio de 2013



Fdo: José Antonio Boga Riveiro



Francisco Parra Fernández

RESUMEN

El bocavirus humano (HBoV) es un virus de la familia *Parvoviridae* descubierto recientemente que causa infecciones del tracto respiratorio. A pesar de su reciente identificación, se está observando un incremento en los casos clínicos y una distribución prácticamente global. Para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y de tratamiento es necesario avanzar en el conocimiento de su biología molecular, comenzando por conocer las proteínas implicadas en el ciclo infectivo viral.

En células infectadas con HBoV se han identificado ARNs mensajeros codificadores de varias proteínas virales no estructurales (NS1, NP1, UP1, UP2, ORFx). Se ha descrito la presencia de NS1 y NP1 en células infectadas con otros parvovirus, pero en ninguno de ellos aparecen UP1, UP2 y ORFx. Es por ello el objetivo de este trabajo obtener las regiones codificadoras de estas proteínas a partir de genomas virales presentes en muestras de pacientes infectados con HBoV y producirlas de forma recombinante en un sistema de expresión bacteriano. Esto permitiría disponer de algunas de las herramientas (regiones codificantes de estas proteínas e incluso las propias proteínas) necesarias para avanzar en el conocimiento sobre la biología molecular del HBoV.

SUMMARY

The human bocavirus (HBoV), a member of *Parvoviridae*, was recently identified as cause of respiratory and enteric infections. An increase in clinical cases and a global distribution are observed. The development of diagnostic and therapeutic methods supports the study of the molecular biology of HBoV, identifying the viral proteins involved in infective cycle.

In HBoV infected cells, different mRNAs, which coding for non structural proteins (NS1, NP1, UP1, UP2, ORFx), has been detected. Only NS1 and NP1 proteins have been detected in cells infected by other parvovirus. The objective of this work is to amplify the coding regions of these proteins from viral genome, previously extracted from samples of HBoV infected patients, and to produce them in a bacterial expression system, obtaining the necessary tools to increase our knowledge in the molecular biology of the virus.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. José Antonio Boga, tutor principal de este TFM, el haberme aceptado para realizar este trabajo, así como los medios proporcionados, su dedicación, dirección, y especialmente, una ayuda y una paciencia infinitas.

También al Dr. Francisco Parra, cotutor por parte de la Universidad de Oviedo, y a su laboratorio, en especial a Inés Nicieza, el haberme ayudado y colaborado en distintas fases del TFM.

Por supuesto, dar las gracias a todos los miembros de la Sección de Virología, los Doctores María de Oña, Santiago Melón, Marta Elena Álvarez, residentes y técnicos, por haberme aceptado como una parte más del equipo y por su ayuda y medios proporcionados.

Y por último, agradecer a mi familia, amigos y novia el haber estado siempre ahí también.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto FIS 11/01381 (Instituto de Salud Carlos III / Fondos FEDER).

ABREVIATURAS

DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Dinucleótidos
EDTA	Ácido etilén diaminotetraacético
GST	Glutación S-transferasa
HBoV	<i>Human Bocavirus</i> (Bocavirus humano)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Pauta abierta de lectura)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampón fosfato salino)
PSA	Persulfato amónico
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TEMED	Tetrametiletildiamina
Tris	Trishidroximetilaminometano

ÍNDICE

1. Introducción

1.1. Generalidades	8, 9
1.2. Clínica del HBoV	9, 10
1.3. Biología molecular del HBoV	10, 11
1.4. Justificación del trabajo y objetivos	11, 12

2. Materiales y métodos

2.1. *Materiales*

2.1.1. Muestras clínicas	13
2.1.2. Bacterias	13
2.1.3. Vectores plasmídicos	13
2.1.4. Células competentes	13, 14
2.1.5. Enzimas	14
2.1.6. Cebadores	14, 15
2.1.7. Otros reactivos	14

2.2. *Métodos*

2.2.1. Extracción de ácidos nucleicos de muestras clínicas	16
2.2.2. Técnicas de biología molecular	16, 17, 18
2.2.3. Técnicas electroforéticas	18, 19
2.2.4. Producción y purificación de las proteínas recombinantes	19

3. Resultados

3.1. Identificación de muestras positivas para HBoV	20
3.2. Construcción de los vectores recombinantes	20, 21, 22, 23, 24, 25
3.3. Expresión de las proteínas recombinantes	25, 26

4. Discusión

27, 28, 29

5. Conclusiones	30
6. Referencias	31, 32

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

El bocavirus humano (**Figura 1**), de ahora en adelante HBoV, es un virus perteneciente a la familia *Parvoviridae*, más concretamente a la subfamilia *Parvovirinae*. Los miembros que pertenecen a esta subfamilia son virus muy pequeños ya que tienen un diámetro aproximado de 25 nm (el nombre de la familia viene de “parvus”, pequeño), oscilando sus genomas entre las 4 y 6 kb, los cuales consisten en una sola cadena de ADN monocatenario. No poseen envuelta externa y tienen una cápsida icosaédrica. Los géneros que la componen además del citado bocavirus son parvovirus, erythrovirus, dependovirus y amdovirus.

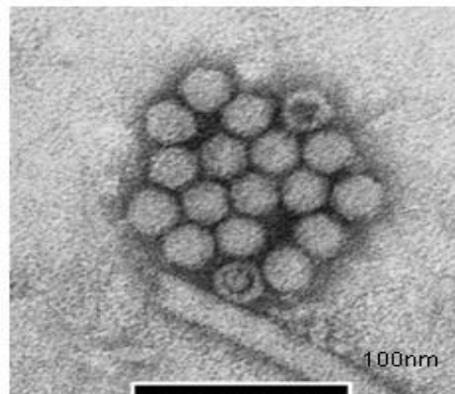


Figura 1. Bocavirus humano (HBoV)

Hasta la fecha se han incluido dentro del género bocavirus al parvovirus bovino (BPV), al canine minute virus (MVC) y al ya mencionado HBoV, siendo el último en ser identificado en 2005 (Allander et al., 2005). Más recientemente, se han identificado otro par de virus muy próximos al HBoV, denominados provisionalmente boca-

virus humano 2 (HBoV-2) y bocavirus humano 3 (HBoV-3), si bien sigue sin estar claro si son genotipos distintos de un mismo virus o son entidades víricas independientes (Arthur et al., 2009; Kapoor et al., 2009).

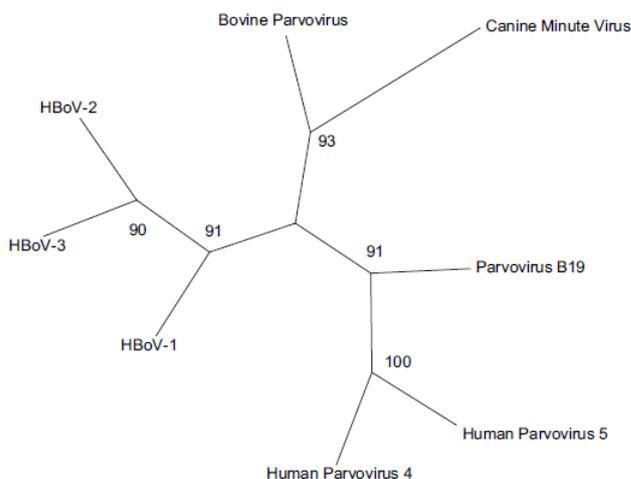


Figura 2. Árbol filogenético de distintos parvovirus

El HBoV fue descubierto en 2005, como se menciona en el anterior párrafo, en aspirados nasofaríngeos de pacientes con infecciones respiratorias gracias a una variante de la PCR llamada “PCR aleatoria” (Allander et al., 2005). Los fragmentos amplificados mediante esta técnica fueron clonados en *E. coli* y secuenciados, obteniendo en algunos casos secuencias similares a parvovirus sin correlación con otros parvovirus humanos, comprobándose que

estaban filogenéticamente más próximas al BPV y al MCV (**Figura 2**), siendo denominado bocavirus humano o HBoV-1.

1.2. Clínica del HBoV

El HBoV es un virus que a pesar de su reciente descubrimiento ha sido identificado a nivel global, con presencia en Europa, América, Asia, África y Oceanía, con una cada vez mayor importancia clínica, con una mayor presencia en época invernal (aunque otros estudios afirman que la mayor incidencia es en primavera), estando presentes entre el 1,5% y el 11,3% en individuos que presentan infecciones respiratorias, afectando a las vías aéreas superiores e inferiores, especialmente en la infancia temprana, llegando en algunos casos a ser graves. El HBoV ha sido asociado a asma exacerbado, bronquiolitis y neumonía (Chow y Esper, 2009). En radiografías de pecho (**Figura 3**) se ven señales de neumonía, como son infiltrados intersticiales, hiperinflación pulmonar o alectasis, que ocurren frecuentemente (43-83%) asociadas a infecciones pediátricas causadas por el HBoV. Aún así, no hay ningún signo radiográfico exclusivo de HBoV (Jartti et al., 2011).

Otros síntomas pueden ser tos, fiebre y rinorrea, así como faringitis y sarpullidos en menor medida (Jartti et al., 2011). Es importante mencionar la alta tasa de coinfección del HBoV junto con otros virus respiratorios en muestras clínicas, pudiendo alcanzar valores de hasta el 83% (Jartti et al., 2011).

Recientemente han sido detectados también en heces de pacientes con gastroenteritis, lo que apunta a que HBoV



Figura 3. Radiografía de una niña de un año y 7 meses con infiltrados intersticiales causados por HBoV. Doctor Elina Lahti, Hospital Universitario de Turku, Finlandia

pueda ser también un virus entérico (Vicente et al., 2007; Boga et al., 2008). También ha sido también detectado junto a otros patógenos intestinales clásicos como rotavirus, norovirus, adenovirus o *Salmonella* con tasas de coinfección que van del 21% al 77% (Chow y Esper, 2009).

La patogénesis del HBoV no ha podido ser investigada a fondo debido al inconveniente de no disponer de sistemas animales o métodos de cultivo *in vitro* del mismo. Recientemente, ha podido ser propagado en cultivo celular de epitelio aéreo primario humano diferenciado a epitelio pseudoestratificado (Dijkman et al., 2009), si bien la complejidad del sistema no permite su uso en laboratorios de virología clínica. Por ello, y en cuanto a la diagnosis del HBoV, el único medio existente actualmente es la detección genómica mediante técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Villa et al., 2008).

1.3. Biología molecular del HBoV

Las características morfológicas y estructurales del HBoV, observables a microscopía electrónica, son similares a las de otros miembros de la familia *Parvoviridae*. Así, presenta una cápsida de simetría icosaédrica sin envoltura y con un diámetro de unos 25 nm (**Figura 1**). Esta cápsida está formada por la unión entre sí de distintas unidades de la proteína VP2, con bastante similitud al parvovirus B19.

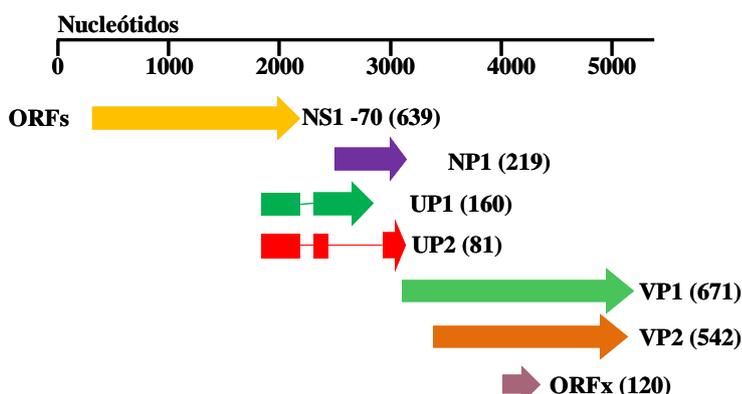


Figura 4. Esquema de la distribución de las distintos ORFs encontradas en el genoma del HBoV.

Su genoma es una única molécula de ADNmc de 5 kpb (**Figura 4**) en cuya secuencia se encuentran los ORFs que codifican dos proteínas no estructurales (NS1 y NP1), de función hasta ahora desconocida, si bien es cierto que ambas parecen estar involucrada en la replicación del ADN viral (Li et

al., 2013), y de dos proteínas estructurales que son VP1 y VP2. Estas últimas están formadas a partir del mismo transcrito usando un “splicing” alternativo, por lo que VP1 es más larga por su extremo amino que VP2 (Allander et al., 2005). Este extremo amino parece ser que juega un papel crucial en los procesos infectivos de algunos parvovirus (Bönsch et al., 2008). Su genoma no codifica para ninguna polimerasa y depende de las polimerasas de la célula infectada para la replicación.

Por analogía con otros miembros de la familia, se supone que tras la entrada del virus en la célula huésped, el ADN monocatenario es transportado al núcleo donde es transformado a ADN bicatenario por las polimerasas del huésped, para posteriormente ser transcrito y dar

lugar a diferentes ARNm. Gracias a la propagación de HBoV en cultivo de epitelio respiratorio pseudoestratificado, se han identificado en estas células varios ARNm. Algunos presentan capacidad para codificar las proteínas ya mencionadas, así como otras proteínas a las que se les ha denominado UP1, UP2 y ORFx sin homología con otros miembros del género (Dijkman et al., 2009). A través de técnicas inmunofluorescentes se ha demostrado, como era de esperar, que NS1, NP1, VP1 y VP2 son producidas durante la infección viral (Shirkooi et al., 2010), mientras que sigue sin saberse si UP1, UP2 y ORFx se producen también durante la infección. UP1 y UP2 se caracterizan porque su secuencia se encuentra fragmentada a lo largo del genoma viral, además de compartir secuencia entre sí y con NS1 (fragmento 5' de UP1 y UP2) y con NP1 (fragmento 3' de UP2) (**Figura 4**). La secuencia de ORFx, por su parte, se localiza dentro de la secuencia de VP2, pero en otro marco de lectura (**Figura 4**).

Otra característica importante del genoma de los bocavirus (así se ha visto en el BPV y el MVC) es la presencia de unas secuencias palindrómicas (ITR) de aproximadamente 200 nucleótidos con abundantes GC en los extremos del genoma. Estas secuencias pueden plegarse sobre sí mismas para dar lugar a estructuras en forma de horquilla, las cuales tienen una gran importancia funcional al poseer secuencias cis-activas que pueden regular la replicación y el empaquetamiento del genoma de los bocavirus; sin embargo, en el HBoV estas secuencias ITR son por el momento desconocidas.

1.4. Justificación del trabajo y objetivos

El cada vez mayor número de casos de pacientes infectados por HBoV y que en ocasiones los síntomas originados sean graves hace que sea necesario un profundo conocimiento de la biología del HBoV. Aumentar nuestros conocimientos sobre su ciclo infectivo y los genes que se expresan durante el mismo (y por tanto, las proteínas implicadas) abre el camino hacia el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, así como de nuevas terapias basadas en antivirales o vacunas.

Este trabajo fin de máster (TFM) es parte de un proyecto de investigación titulado “Identificación de las proteínas virales producidas en células infectadas por bocavirus humano”, en el cual, entre otros objetivos parciales, está la producción de las diferentes proteínas virales en sistemas heterólogos usando técnicas de ADN recombinante. Este es el objetivo de este TFM para cuya consecución debemos seguir los siguientes pasos:

1. Identificar muestras clínicas de pacientes infectados con HBoV que nos sirvan como fuente de genoma viral.
2. Obtención de las regiones codificadoras de las proteínas NS1, NP1, UP1 y UP2 de HBoV a partir del genoma viral. Secuenciación completa de dichos fragmentos.
3. Inserción de dichas regiones en vectores de expresión bacteriana y obtención de bacterias transformadas con ellos para la producción heteróloga de NS1, NP1, UP1 y UP2.
4. Producción y purificación de las proteínas recombinantes NS1, NP1, UP1 y UP2 producidas en un sistema bacteriano.

Las proteínas recombinantes obtenidas serán objeto de posteriores estudios. Así podría averiguarse si UP1 y UP2 se producen realmente mediante la búsqueda de anticuerpos contra estas proteínas en sueros de pacientes con infección previa por HBoV o tratando de demostrar su presencia en muestras clínicas mediante anticuerpos específicos contra dichas proteínas. También se podría realizar estudios de estructura y función con las proteínas recombinantes purificadas. En definitiva los objetivos de este TFM abrirían la puerta a diferentes investigaciones para conocer más sobre la biología molecular del HBoV.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Muestras clínicas

Cincuenta exudados faríngeos procedentes de 50 pacientes menores de 14 años y con síntomas de infección respiratoria fueron recogidos en medio de transporte de virus (UTM Kit, Copan, EUA). Las muestras fueron enviadas el mismo día al laboratorio en donde fueron procesadas a su llegada para el diagnóstico de HBoV.

2.1.2. Bacterias

Las cepas bacterianas usadas fueron *Escherichia coli* JM109 {*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rK⁻,mK⁺), *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lacIqZ* Δ M15]} para propagar los plásmidos recombinantes y BL21(DE3)p-LysS {F⁻, *ompT*, *hsdSB* (rB⁻, mB⁻), *dcm*, *gal*, λ (DE3), pLysS, Cmr} para la producción de las proteínas recombinantes.

Para el cultivo de *E. coli* transformadas se utilizó medio LB (Luria-Bertani) modificado, cuya composición se describe en Maniatis et al. (1989) al que se le añadió ampicilina a una concentración final de 100 μ g/mL.

2.1.3. Vectores plasmídicos

El plásmido utilizado para clonar los distintos fragmentos del genoma de HBoV amplificados mediante PCR fue el pGEM-T (Promega, Madison, WI).

Para la producción de las proteínas recombinantes, las secuencias codificantes de las mismas fueron clonadas en el vector de expresión pGEX-4T1 (GE Healthcare) con lo que se construye una proteína de fusión cuyo extremo amino es la GST y su extremo carboxilo la proteína de interés unidos mediante una secuencia aminoacídica que es reconocida por la proteasa trombina.

2.1.4. Células competentes

Los vectores plasmídicos fueron propagados en *E. coli* JM109 (Promega).

Para la producción de proteínas, los vectores de expresión recombinantes fueron usados para transformar bacterias competentes *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Promega).

2.1.5. Enzimas

Para la amplificación de los fragmentos mediante PCR se usó la ADN polimerasa Taq (Bioline). La digestión enzimática de los diferentes plásmidos se realizó mediante las endonucleasas de restricción *EcoRI*, *BamHI*, *EcoRV*, *Sall* y *Eco47III* (Promega). La ligación de fragmentos de ADN se llevaron a cabo mediante la T4 ADN ligasa (Promega). Para digerir las proteínas de fusión recombinantes se utilizó trombina (GE Healthcare).

2.1.6. Cebadores

Los cebadores utilizados en las diferentes reacciones de PCR llevadas a cabo en este TFM han sido sintetizados por Thermo y aparecen en la **Tabla 1**.

2.1.7. Otros reactivos

Se utilizó IPTG (GE Healthcare) para inducir la producción de las proteínas recombinantes insertadas en las bacterias transformadas.

Para realizar las electroforesis de ADN se usaron agarosas NuSieve GTG y SeaKem GTG (Lonza), tampón TAE (Millipore) y bromuro de etidio (Sigma Aldrich).

Respecto a las electroforesis de proteínas los reactivos usados fueron acrilamida (Applichem), SDS (Sigma-Adrich), TEMED (VWR International LTD), butanol (Applichem) y PSA (Applichem). Las muestras a analizar fueron disueltas en el tampón 4x SDS sample buffer (Novagen). Para la tinción de las proteínas se utilizó azul de Comassie (Sigma-Adrich) y para desteñir una solución de metanol (Merck) al 7,5% y ácido acético glacial (Merck) al 10%.

Para la determinación de los tamaños moleculares de los fragmentos de ADN y de las proteínas recombinantes se usaron los marcadores de peso comerciales 50bp DNA ladder (New England BioLabs) y LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare), respectivamente.

Tabla 1. Cebadores usados en este trabajo;

Nombre	Secuencia (5'-3') ^a	Uso
<i>Boca1N</i>	gaagacaccgagcctgagac	Detección HBoV
<i>Boca2N</i>	gctgattgggtgtcctgat	Detección HBoV
<i>Boca3N</i>	aaacgtcgtctaactgtcca	Detección HBoV
<i>Boca4N</i>	atatgagcccagcctctct	Detección HBoV
<i>NS1-Bgl-ATG</i>	agatct atggcttcaatcctcctgtgattagagct	Amplificación gen NS1
<i>NS1-Eco-TAA</i>	gaattc tactacttgggtgatgtctcctgtgct	Amplificación gen NS1
<i>NP1-Bam-ATG</i>	ggatcc atgagctcagggaaatgaaagacaagaaa	Amplificación gen NP1
<i>NP1/UP2-Eco-TAA</i>	gaattc taattggaggcatctgcttccatgcttc	Amplificación gen NP1
<i>UPI/2-Bam-EcV-ATG-F</i>	ggattc atgtacactgatcgcgcaagcgaaactagcacaggagacatcacaccaagt gatca	Amplificación gen UPI y UP2
<i>UPI/2-EcV-Bam-ATG-R</i>	gatatc acttggtgatgtctcctgtgctagtttcgctcgcgcatcagtgatcat ggatcca	Amplificación gen UPI y UP2
<i>UPI/2-EcV</i>	gatatc ggggattcggagcggagaagac	Amplificación gen UPI y UP2
<i>UPI-Eco-TAG</i>	gaattc tattgtctttttccccgat	Amplificación gen UPI
<i>UP2-Ec47-F</i>	agcgct acagaagcagcagataact	Amplificación gen UP2
<i>UP2-Ec47-R</i>	agcgct cgcaggtgagttggaggact	Amplificación gen UP2
<i>NS1-Seq1</i>	tcatagttcagtctgagctag	Secuenciación gen NS1
<i>NS1-Seq2</i>	cagcaaacctgatgtttgtac	Secuenciación gen NS1
<i>NS1-Seq3</i>	ctgaaggtaaccaggag	Secuenciación gen NS1
<i>NS1-Seq4</i>	aacgcctagttgttggtg	Secuenciación gen NS1
<i>NS1-Seq5</i>	gtacgactgtactctgacag	Secuenciación gen NS1
<i>NP1-Seq1</i>	atccgacacagtggggagag	Secuenciación gen NP1
<i>NP1-Seq2</i>	gaacaaatccataactgta	Secuenciación gen NP1
<i>NP1-Seq3</i>	ataacactagagaactattg	Secuenciación gen NP1
<i>NP1-SeqR</i>	cctgagctcatctctgtcac	Secuenciación gen NP1
<i>UPI-Seq1</i>	gtaagtactattactttct	Secuenciación gen UPI
<i>UPI-SeqR</i>	tacagtgtatggattgttc	Secuenciación gen UPI
<i>T7</i>	taatacgactcactataggg	Secuenciación inserto en pGEM-T
<i>SP6</i>	gatttaggtgacactatag	Secuenciación inserto en pGEM-T
<i>GEX5</i>	acgtattgaagctatcccac	Secuenciación inserto en pGEX-4T1
<i>GEX3</i>	ggcatccgcttacagacaag	Secuenciación inserto en pGEX-4T1

^a En negrita se destacan los sitios de restricción creados, que aparecen en el nombre del cebador (Bam, BamHI; Bgl, BglII; Eco: EcoRI; EcV: EcoRV y Ec47, Eco47III).

2.2. Métodos

2.2.1. Extracción de ácidos nucleicos de muestras clínicas

Los ácidos nucleicos presentes en los exudados faríngeos enviados en medio de transporte de virus fueron extraídos y purificados mediante el extractor automático COBAS Ampliprep (Roche), que se basa en la tecnología de partículas magnéticas recubiertas de sílice.

2.2.2. Técnicas de biología molecular

2.2.2.1. Amplificación genómica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La obtención de los fragmentos de ADN de interés se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa. Los reactivos presentes en la mezcla de amplificación se describen en la **Tabla 2** a la que se le añade el ADN de interés y el protocolo de amplificación seguido se observa en la **Figura 5**.

Tabla 2. Reactivos usados en la PCR

Reactivo	(por muestra)
Tampón (x10)	2,5 µl
MgCl ₂ (50mM)	1 µl
dNTPs (1 mM/cada uno)	5 µl
Cebadores (12,5µM/cada uno)	1 µl
Taq DNA pol (5 U/µl)	0,1 µl
ADN a amplificar	1 - 5 µl
Agua	hasta 25 µl

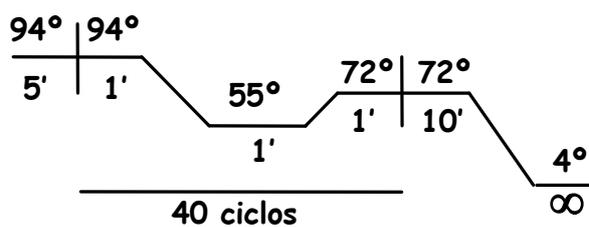


Figura 5. Protocolo de amplificación utilizado

Para aumentar la sensibilidad de la técnica se realizaron PCRs anidadas, que consisten en la realización de dos PCR consecutivas donde los cebadores utilizados en la segunda PCR anillan en el amplicón generado en la primera PCR. El protocolo de amplificación y la mezcla de reacción de la segunda PCR son los descritos en la **Tabla 1** y en la **Figura 5**. En este caso el ADN a amplificar son 3 µl del producto de la primera PCR.

2.2.2.2. Purificación de fragmentos de ADN y vectores plasmídicos

Los fragmentos de ADN tras ser analizados en geles de agarosa fueron purificados mediante Montage DNA Gel Extraction Kit (Millipore) para ser secuenciados o mediante ATP Gel/PCR Extraction Kit (ATP Biotech) para su uso en reacciones de ligación.

Para la purificación de ADN plasmídico a partir de bacterias *E. coli* JM109 transformadas se utilizó Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante.

2.2.2.3. Digestión de los vectores plasmídicos con enzimas de restricción

Para digerir los plásmidos con las endonucleasas de restricción se prepara una mezcla de reacción tal como se indica en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Mezcla de digestión

Reactivo	(por muestra)
Tampón de endonucleasas (x10)	2 µl
Enzima/Enzimas de restricción	1U de cada uno
Plásmido	5 µl
Agua	hasta 20 µl

El tampón de endonucleasas usado es el recomendado por la casa comercial (Promega) ya sea para digestiones simples o dobles. La mezcla de restricción se incuba a 37°C durante 2 horas y se procede a su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa (**apartado 2.2.3.1.**).

2.2.2.4. Inserción de fragmentos de interés en vectores plasmídicos

Los amplicones extraídos de geles de agarosa son ligados al plásmido pGEM-T presente en el preparado comercial pGEM-T easy (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos de ADN que codifican proteínas de interés son ligados al plásmido de expresión pGEX-4T1, previamente digeridos con enzimas de restricción, preparando la mezcla de ligación descrita en la **Tabla 3** que se incuba a 4°C durante toda la noche.

Tabla 3. Reactivos usados en la mezcla de ligación.

Reactivo	(por muestra)
Tampón de ligación (x10)	1,00 µl
T4 ADN ligasa (1U/µl)	1,00 µl
Plásmido	1,00 µl
Amplicón purificado	3,00 µl

Las mezclas de ligación fueron usadas para transformar bacterias competentes *E. coli* JM109 presentes en el preparado comercial pGEM-T easy (Promega). Brevemente, se mezclan 5 µl de la mezcla de ligación con 50 µl de bacterias competentes, mantenidas a -80°C hasta su uso, y se incuban 20' en hielo. Pasado ese tiempo, se incuban a 42°C durante 2' y se devuelven al hielo. Se añade 500 µl de medio LB y se incuban a 37°C durante 45'.

Finalmente, se siembran en una placa de Petri con medio LB y ampicilina y se mantiene a 37°C durante toda la noche hasta la aparición de colonias.

Para saber si las colonias que crecen durante la noche portan el plásmido recombinante, 25 µl de LB son inoculados con cada una de las colonias. De ello, 20 µl se almacenan en la nevera y con los 5µl restantes se utilizan para ser amplificados mediante una PCR (**apartado 2.2.2.1.**) utilizando como parejas de cebadores T7/SP6 o Gex5/Gex3 (ver **Tabla 1**) según el vector plasmídico sea pGEM-T o pGEX-4T1, respectivamente. Todos los insertos presentes en los plásmidos recombinantes son secuenciados (**apartado 2.2.2.3.**).

2.2.2.5. Secuenciación de los fragmentos amplificados y clonados

Amplicones purificados a partir de geles de agarosa o plásmidos recombinantes fueron secuenciados usando el preparado comercial Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los cebadores usados se recogen en la **Tabla 1**.

Las reacciones de secuenciación fueron purificadas mediante el Big Dye X-terminator Purification Kit (Applied Biosystems) antes de ser analizadas mediante un ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.2.3. Técnicas electroforéticas

2.2.3.1. Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN generados tras las PCR o tras las digestiones hechas con los enzimas de restricción fueron analizados en geles de agarosa (SeaKem GTG) al 0,7% en tampón TAE (Tris-Acetato 0,04M, EDTA 0,002M), usándose bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/mL para la visualización del material genético tras iluminación con luz UV. Para analizar fragmentos de pequeño tamaño (< 500 pb) se utilizó agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve GTG) al 2%.

2.2.3.2. Electroforesis en gel de acrilamida

Las proteínas fueron separadas siguiendo el método descrito por Laemmli (1970), basado en geles homogéneos de acrilamida (en este caso la concentración fue del 12%), con un gel de empaquetamiento al 3,5%. Antes de cargar las muestras en el gel, éstas han de ser calentadas a 95°C durante 5 minutos en el tampón de disociación de proteínas (4x SDS sample buffer).

Una vez hecho esto, se aplicó una corriente eléctrica de 150V durante una hora en un aparato "Mini-protean II" (BioRad) para que se produjese la separación de las proteínas. Pasado esto, se tiñó el gel con azul de Comassie durante media hora en un baño a 56°C y para la visualización final del resultado del gel se destiñó con una solución de ácido acético al 10% y metanol al 7,5%, también a 56°C y en un baño.

2.2.4. Producción y purificación de las proteínas recombinantes

2.2.4.1. Producción de las proteínas recombinantes

Bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con los vectores recombinantes derivados del pGEX-4T1 y que porten genes codificantes de las proteínas de interés son crecidas en 50 ml de LB con ampicilina a 37°C. Cuando se alcanza la fase exponencial de crecimiento se induce mediante incubación durante 2 horas a 37°C en presencia del inductor (IPTG 1mM).

Pasadas esas 2 horas, las bacterias son recogidas por centrifugación. El sedimento celular es resuspendido en 1 ml de PBS. La rotura de las bacterias se realiza mediante ciclos de congelación/descongelación seguidas de tratamiento con ultrasonidos mediante un sonicador (Branson). Una vez rotas, se centrifuga a 15.000 rpm durante 15' para separar la fracción soluble (sobrenadante) y la fracción insoluble (sedimento).

Para analizar el rendimiento de la inducción, así como en cual fracción está la proteína recombinante se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida (**apartado 2.2.3.2.**).

2.2.4.2. Purificación de las proteínas recombinantes

La purificación de las proteínas recombinantes se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad basada en columnas empaquetadas con una matriz de glutatión-sefarosa usando el preparado comercial GST Bulk Kit (GE Healthcare) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La liberación de las proteínas de interés se realizó mediante incubación de la matriz con trombina, que cortaba la proteína de fusión haciendo que la proteína recombinante se eluyese y que la GST quedara retenida por la matriz.

Los productos de la cromatografía se analizan mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida. (**apartado 2.2.3.2.**).

3. RESULTADOS

3.1. Identificación de muestras positivas para HBoV

La presencia de genoma de HBoV en cincuenta exudados faríngeos recogidos durante Enero de 2013 se puso de manifiesto mediante su purificación automática con un COBAS Ampliprep y posterior PCR anidada usando las parejas de cebadores Boca1N ~ Boca2N y Boca3N ~ Boca4N (**Tabla 1**).

El análisis electroforético de las reacciones de amplificación demostró la presencia de un fragmento cuyo tamaño molecular correspondería con el esperado (259 pb) en 4 muestras, lo que representa un 8% del total de muestras analizadas. En la **Figura 6** se observa dicho análisis electroforético en 24 de esas muestras. Los amplicones fueron purificados y secuenciados utilizando como cebadores los oligonucleótidos Boca3N y Boca4N. El resultado de la secuenciación confirmó que las muestras eran positivas para HBoV.

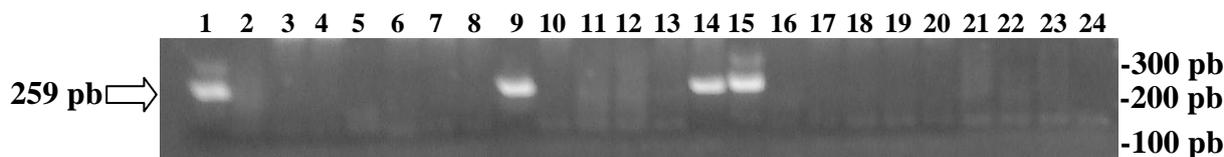


Figura 6. Análisis electroforético de muestras positivas (líneas 1, 9, 14 y 15) y negativas (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24) para HBoV. Se indica la posición de marcadores de peso molecular. La flecha indica el amplicón de HBoV.

3.2. Construcción de los vectores recombinantes portadores de los genes de interés.

La estrategia seguida fue la síntesis de diferentes amplicones conteniendo los genes completos flanqueados por sitios de restricción añadidos durante los procesos de amplificación. Al igual que para la detección de HBoV en muestras clínicas, la amplificación de los genes se realizó mediante PCRs anidadas utilizando como ADN de partida el material genético extraído de dos muestras positivas para HBoV. Así, en primer lugar, se amplificó un fragmento de ADN conteniendo la región que codifica las proteínas virales NS1, NP1, UP1 y UP2 usando como cebadores la pareja NS1-Bgl-ATG ~ NP1-Eco-TAA mediante el protocolo descrito en 2.2.2.1. El producto de amplificación de esta primera PCR fue a su vez amplificado mediante dos parejas de cebadores NS1-Bgl-ATG ~ NS1-Eco-TAA y NP1-Bam-ATG ~ NP1-Eco-TAA para dar lugar a los genes codificantes de NS1 y NP1, respectivamente (**Figura 7**). El producto de estas PCRs anidadas fue analizado mediante electroforesis en

geles de agarosa (**Figura 8**). Los amplicones fueron purificados para ser secuenciados usando como cebadores los descritos en la tabla 1, así como para su clonación en el vector pGEM-T para dar lugar a los vectores pGNS1 y pGNP1, respectivamente.

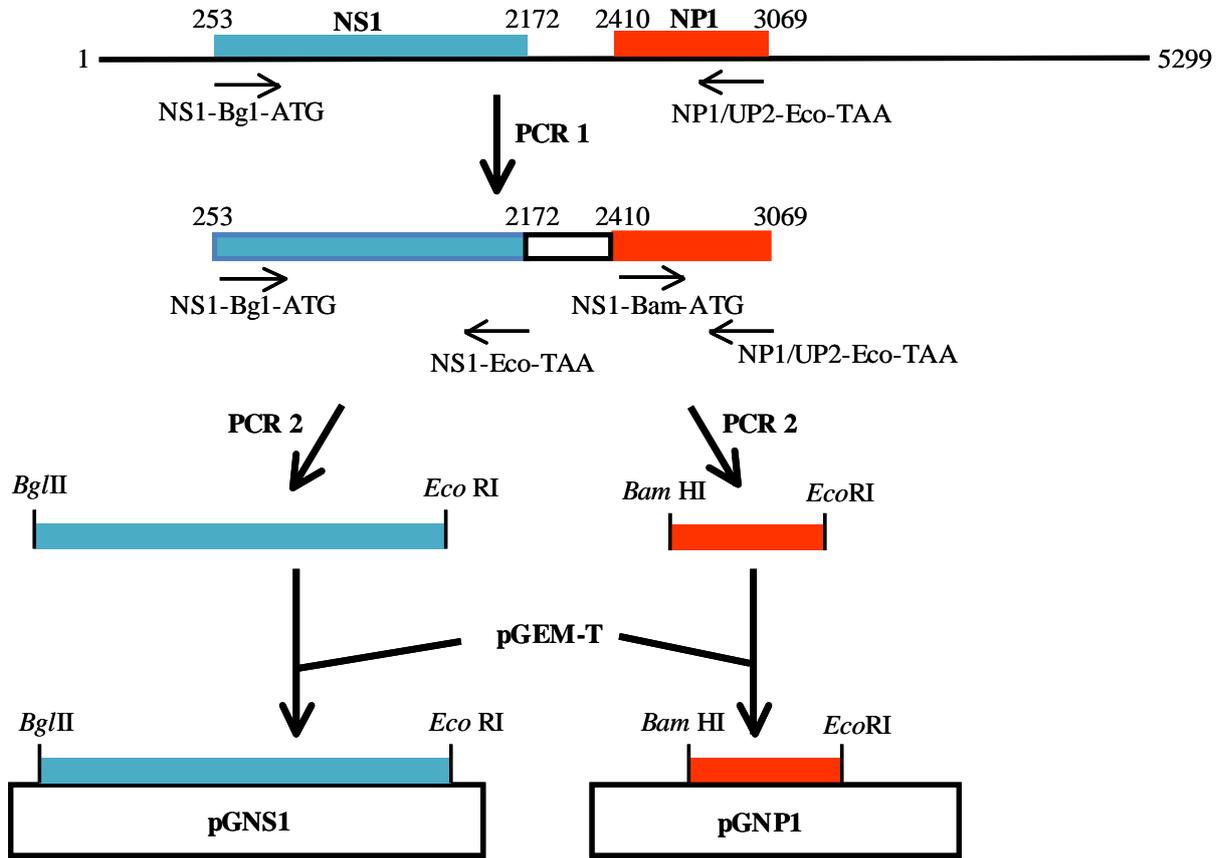


Figura 7. Estrategia de amplificación y ligación en pGEM-T de los genes codificantes de NS1 y NP1. Los números a ambos lados de cada amplicón indican su posición en el genoma del HBoV st2 DQ000496.

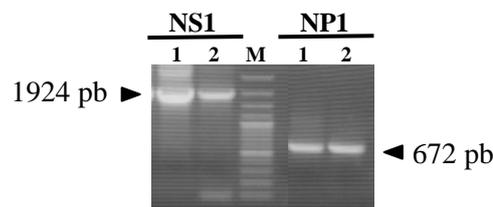


Figura 8. Análisis electroforético de los amplicones de NS1 y NP1 obtenidos a partir del genoma viral extraído de dos muestras positivas para HBoV (1 y 2). M, marcador de peso molecular

En el caso de los genes UP1 y UP2, la estrategia exige reconstruir los genes completos ya que estos casos se hallan divididos en dos y tres fragmentos, respectivamente. En primer lugar se obtiene el fragmento 5', que es el mismo en ambos genes. Dado su relativamente pequeño tamaño (51 pb), se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios y antisentido UP1/2-Bam-EcV-ATG-F y UP1/2-EcV-Bam-ATG-R, que representaban las dos hebras de ADN (51 bases cada uno) más los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RV (12 bases) más una adenina en el extremo 3' (**Tabla 1**). Se mezclaron diversas cantidades equimolares de ambos oligonucleótidos, se incubaron a 95°C durante 10' y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. El análisis electroforético de una alícuota de cada reacción de anillamiento se observa en la **Figura 9**, en donde se puede ver una banda de intensidad creciente que correspondería con el tamaño esperado (64 pb).

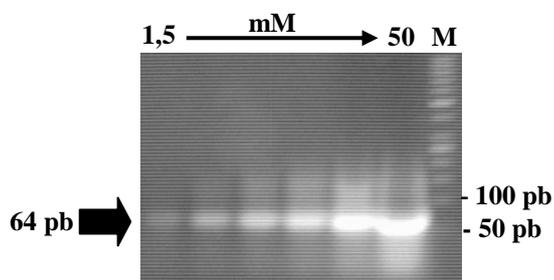


Figura 9. Análisis electroforético de la reacción de anillamiento de los oligonucleótidos UP1/2-Bam-EcV-ATG-F y UP1/2-EcV-Bam-ATG-R. M, marcador de peso molecular

Debido a la adenina añadida en el extremo 3' de ambos oligonucleótidos, el producto de su anillamiento, denominado UP1/2, era susceptible de ser clonado en el vector pGEM-T. Tras la ligación y posterior transformación, se analizaron diversas colonias mediante la amplificación de su material genético usando como cebadores la pareja T7 ~ SP6. En la **Figura 10A** se esquematiza la posición de dichos cebadores en el pGEM-T y los tamaños de los amplicones en el caso de que UP1/2 se inserte (264 pb) dando lugar al plásmido recombinante pUP1/2 o no se inserte (160 pb) dando lugar a un pGEM-T religado. El análisis electroforético de los amplicones de varias colonias nos permite observar en cuales de ellas ha habido inserción (**Figura 10B**). Se purificó el plásmido recombinante de cuatro de las colonias, procediendo a su secuenciación para confirmar la presencia del inserto.

Continuando con la estrategia el siguiente paso consiste en obtener el fragmento 3' del gen UP1 y los fragmentos intermedio y 3' del UP2. Para ello, el producto de amplificación obtenido con la pareja de cebadores NS1-Bgl-ATG ~ NP1-Eco-TAA descrito anteriormente es utilizado en tres PCRs anidadas usando las parejas de cebadores UP1/2EcV ~ UP1-Eco-

TAG, UP1/2EcV ~ UP2-Ec47-R y UP2-Ec47-F ~ NP1/UP2-Eco-TAA para amplificar los fragmentos 3' del gen UP1 e intermedio y 3' del UP2, respectivamente (**Figura 11**).

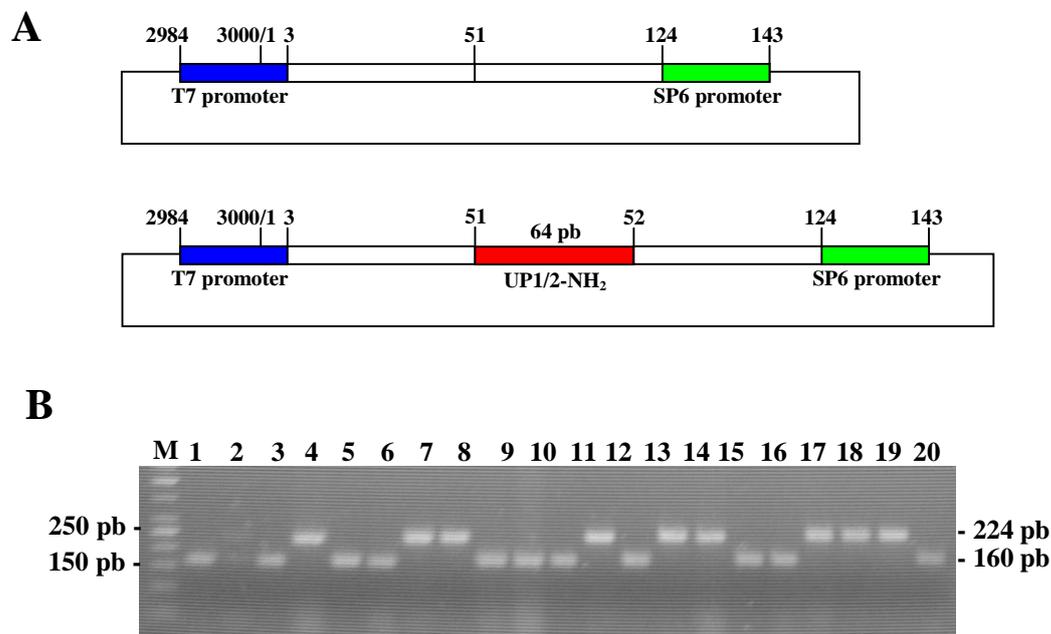


Figura 10. A) Esquema de la posición de los cebadores SP6/T7 en el caso de que el fragmento UP1/2 no se inserte (pGEM-T, arriba) y si se inserte (pGUP1/2, abajo). B) Análisis electroforético de colonias transformadas con pGEM-T (1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 16, 17, 21) y con pGUP1/2 (4, 7, 8, 12, 14, 15, 18, 19, 20). M, marcadores de peso molecular.

El producto de estas PCRs anidadas fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa. Los amplicones fueron purificados para ser secuenciados usando como cebadores los descritos en la **Tabla 1**, así como para su clonación en el vector pGEM-T para dar lugar a los vectores pGUP1-3', pGUP2-I y pGUP2-3', respectivamente.

La reconstrucción de los genes UP1 y UP2 se esquematiza en la **Figura 11**. Así el fragmento obtenido al digerir pGUP1-3' con *EcoRV* y *SalI* (presente en el pGEM-T) es ligado al vector pGUP1/2 previamente digerido con los mismos enzimas para dar lugar al pGUP1, que contiene el gen UP1 completo. Por otro lado, el fragmento obtenido al digerir pGUP2-I con *EcoRV* y *SalI* (presente en el pGEM-T) es ligado al vector pGUP1/2 previamente digerido con los mismos enzimas para dar lugar al pGUP2-5'I. Después el fragmento obtenido al digerir pGUP2-3' con *Eco47III* y *SalI* (presente en el pGEM-T) es ligado al vector pGUP2-5'I previamente digerido con los mismos enzimas para dar lugar al pGUP2, que contiene el gen UP2 completo. Las construcciones finales son secuenciadas para confirmar la no presencia de mutaciones indeseadas.

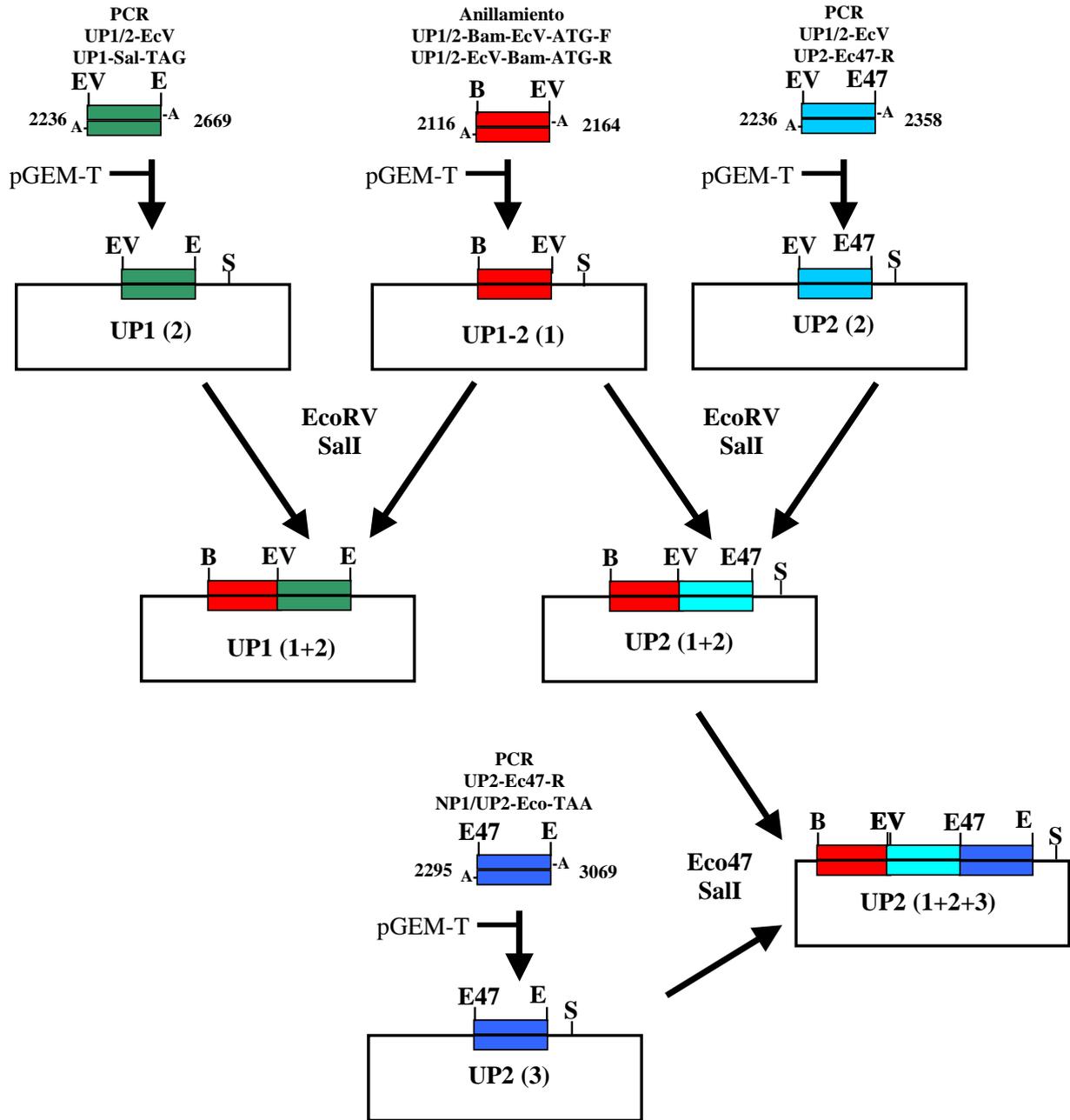


Figura 11. Estrategia de construcción de los vectores recombinantes pUP1 y pUP2 (ver explicación en el texto). Los números a ambos lados de cada amplicón indican su posición en el genoma del HBoV st2 DQ000496.

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes pGNS1, pGNP1, pGUP1 y pGUP2 se procedió a subclonar los genes completos al vector de expresión pGEX-4T1. Para ello, el fragmento que contiene el gen NS1 obtenido al digerir pGNS1 con *Bgl*I y *Eco*RI es ligado al vector pGEX-4T1 digerido con *Bam*HI y *Eco*RI para dar lugar al vector de expresión recombinante pXNS1. Por otra parte, los fragmento que contienen los genes NP1, UP1 y UP2 obtenidos al digerir pGNP1, pGUP1 y pGUP2, respectivamente con *Bam*HI y *Eco*RI son

ligados al vector pGEX-4T1 digerido con los mismos enzimas para dar lugar a los vectores de expresión recombinantes pXNP1, pXUP1 y pXUP2, respectivamente.

3.3. Expresión de las proteínas recombinantes

Los vectores recombinantes construidos fueron purificados y usados para transformar bacterias *E.coli* BL21(DE3)pLysS. Las bacterias transformadas fueron utilizadas para producir las diferentes proteínas recombinantes según el apartado 2.2.4.1. El análisis electroforético del extracto celular de bacterias transformadas con pXNP1, pXUP1 y pXUP2 demostró que en las bacterias inducidas se producían proteínas del tamaño esperado para las proteínas de fusión GST-NP1 (52,1 kDa), GST-UP1 (44,3 kDa) y GST-UP2 (37,1 kDa). Sin embargo, en el extracto celular de bacterias transformadas con pXNS1 se observó la presencia de una proteína de menor tamaño (~ 60 kDa) que el esperado para la proteína de fusión GST-NS1 (98,4 kDa) (**Figura 12**).

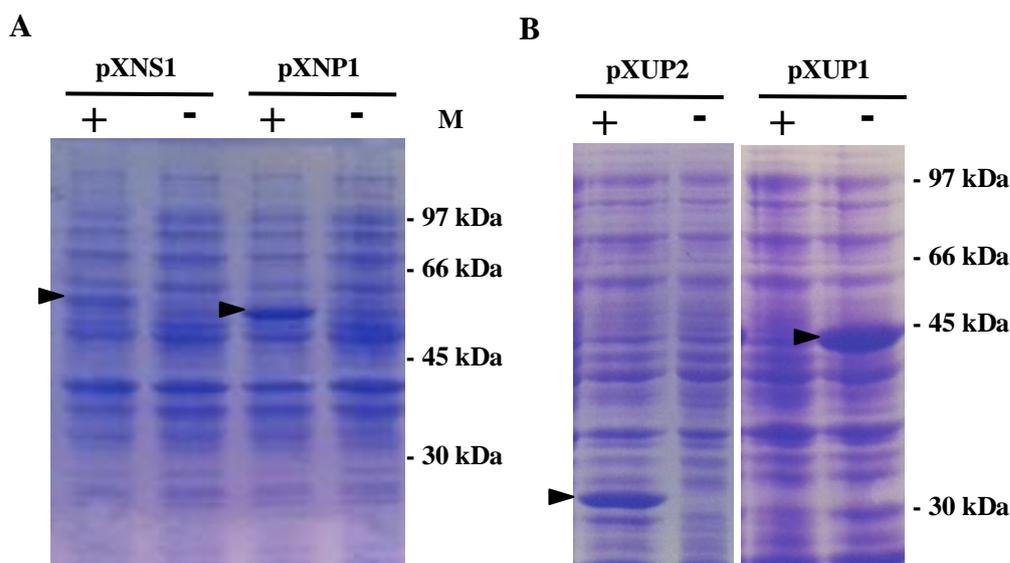


Figura 12. Análisis electroforético de extractos inducidos (+) y no inducidos (-) de bacterias transformadas con pXNS1 y pXNP1 (panel A) y con pXUP2 y pXUP1 (panel B)

Bacterias transformadas con pXNP1, pXUP1 y pXUP2 e inducidas con IPTG fueron recogidas por centrifugación, procediendo a la rotura del sedimento celular y su posterior separación de las fracciones solubles e insolubles (**apartado 2.2.4.1**). El análisis de dichas fracciones mediante electroforesis en geles de poliacrilamida permitió observar como las tres proteínas de fusión permanecían en la fracción soluble lo que permitía su purificación mediante cromatografías de afinidad (**apartado 2.2.4.2**).

El análisis electroforético de las diferentes fracciones obtenidas en la purificación de las proteínas permitió observar que mientras NP1 y UP1 eran purificadas (**Figura 13**), la fusión GST-UP2 permanecía unida a la matriz a pesar del tratamiento con trombina.

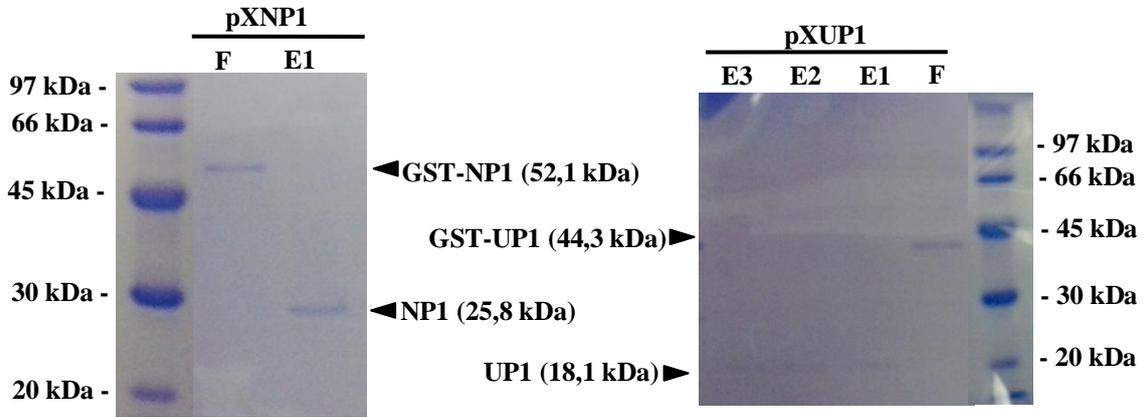


Figura 13. Análisis electroforético de las fracciones obtenidas en la purificación de NP1 (izquierda) y UP1 (derecha). F, proteína de fusión retenida por la matriz; E1, E2 y E3, eluidos tras la incubación con trombina.

4. DISCUSIÓN

Las infecciones de las vías respiratorias son una causa importante de morbilidad y mortalidad. Se estima que son causa de aproximadamente 4 millones de muertes al año en todo el mundo.

Del total de ingresos hospitalarios en los Estados Unidos, cerca del 10% se atribuyen a enfermedades del sistema respiratorio con una mortalidad estimada de 232.000 en 2005. Aunque se conoce desde hace tiempo que diversos virus respiratorios como el virus de la gripe, el virus respiratorio sincitial (VRS), los parainfluenzavirus o ciertos adenovirus son responsables de un gran número de infecciones del tracto respiratorio, a principios de este siglo se estimaba que con los métodos de detección actuales, un tercio de estas infecciones quedaban sin diagnosticar (Murray et al. 2001). Por ello, no es raro que con los avances en los métodos de detección hayan aparecido recientemente numerosos virus con capacidad para causar infecciones respiratorias, incluyendo el metapneumovirus humano, los coronavirus humanos NL63, HKU1 y SARS-CoV, los poliomavirus Ki y WU y el bocavirus humano (HBoV).

Actualmente se sabe que el HBoV es el causante de infecciones del tracto respiratorio superior, produciendo entre el 1,5 y el 11,3% de los casos (Jartti et al., 2011). La diferencia se debe probablemente al uso, en cada estudio de distintos grupos de pacientes (niños, adultos, ambos o con clínica de base, inmunodeprimidos, asmáticos, etc.), de distintas muestras respiratorias y distinguiendo o no entre infección del tracto superior y del tracto inferior. En nuestro estudio, seleccionamos 50 niños (menores de 14 años) con síntomas de infección del tracto respiratorio superior. A pesar del bajo número de muestras, obtuvimos 4 positivos, lo que representaría una incidencia del 8%, cercana a las tasas más altas descritas y similar a la ya descrita por el Servicio de Microbiología del HUCA, donde en un estudio realizado con 366 muestras respiratorias pertenecientes a 339 niños (edad media 2.9 ± 3.4 años, (rango 3 días-13 años) se encontró que el VRS era el virus más frecuente, seguido de HBoV con una incidencia cercana al 7% (Villa et al., 2009). Una característica de los HBoV es su alta tasa de coinfección, en el trabajo ya citado se reportaba que más de un tercio de las muestras positivas para HBoV lo eran también para otro virus, especialmente VRS. En nuestro caso, dos de las muestras también fueron positivas para VRS apoyando la alta tasa de coinfección que presenta el HBoV.

El HBoV es, hasta la fecha, el único representante del género Bocavirus que infecta a humanos y junto con el Parvovirus B19, los únicos miembros de la familia Parvoviridae que son patógenos del hombre. Este hecho le convierte en un miembro importante de dicha familia y apoya la necesidad de avanzar en el conocimiento de su biología para abrir el camino hacia el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, así como de nuevas terapias como antivirales o vacunas.

En este contexto se incluyen los resultados de este trabajo de fin de máster con el que se pretendía disponer de las herramientas necesarias para comenzar a diseccionar la biología molecular del HBoV. Así una de las primeras etapas es conocer que proteínas están involucradas en el ciclo infeccioso viral. En este sentido, aunque HBoV no ha podido ser cultivado en las líneas celulares habituales, si se ha conseguido propagar en un sistema complejo (cultivo celular de epitelio respiratorio pseudoestratificado), donde se han identificado ARNs mensajeros codificadores de varias proteínas virales no estructurales (NS1, NP1, UP1, UP2, ORFx) (Dijman et al., 2009).

Aunque se ha descrito la presencia de NS1 y NP1 en células infectadas con otros parvovirus, incluyendo otros miembros del género Bocavirus, su función no está clara. Además es la primera vez que se identifica UP1, UP2 y ORFx. El estudio de la existencia de estas proteínas, así como su función desconocida para algunas o poco clara para otras, exige en primer lugar el disponer de las secuencias codificadoras de estas proteínas. Esto supondría disponer de los genes susceptibles de ser clonados en vectores de expresión adecuados para, por ejemplo transfectar células y observar que ocurre. En este sentido, recientemente se ha demostrado que las proteínas NS1 de parvovirus canino 2 y NP1 de HBoV inducen apoptosis en células HeLa (Saxena et al., 2013; Sun et al., 2013). En este sentido, hemos conseguido disponer de cassetes génicos que incluyen los genes completos de NS1, NP1, UP1 y UP2 mediante la amplificación de sus regiones codificadoras y su inserción en el vector pGEM-T. Destacar la dificultad para conseguir los genes UP1 y UP2 dado que se encontraban fragmentados en el genoma viral.

Otro objetivo planteado es la producción de las proteínas recombinantes en un sistema heterólogo. El sistema elegido fue construir fusiones con GST valiéndonos de un vector de expresión de la serie pGEX (Promega) y obtener bacterias *E. coli* transformadas con los vectores recombinantes productoras de las proteínas de interés tras inducirlas con IPTG. El sistema fue elegido debido a la facilidad y rapidez del cultivo de *E. coli* y de la facilidad al

purificar proteínas de fusión con GST valiéndonos de cromatografías de afinidad usando matrices de sefarosa-glutatin (Harper y Speicher, 2011).

Tal como se esperaba, se consiguió producir con éxito las proteínas NP1 y UP1. Sin embargo, en el caso de NS1 se obtuvo una proteína de fusión con un peso molecular más pequeño del esperado. Este hecho podría ser achacado a la presencia de un codón de parada en la secuencia, posibilidad que descartamos ya que se secuenció el gen completo o a una degradación por parte de alguna proteasa presente en el cultivo celular. Otro problema surgió al no ser capaz de eluir la proteína UP2 de la matriz tras tratar a la fusión GST-UP2 con trombina. La razón podría ser una secuencia incorrecta en forma de mutación en el sitio de reconocimiento de la trombina, descartada ya que se secuenció el gen completo o que la fusión se pliegue de tal forma que ese sitio no sea “visible” para la proteasa.

En cualquier caso, la obtención de dos proteínas virales recombinantes abre la puerta a avanzar en el proyecto del que este trabajo forma parte. Así podremos averiguar si UP1 y UP2 se producen realmente mediante la búsqueda de anticuerpos contra estas proteínas en sueros de pacientes con infección previa por HBoV, o tratando de demostrar su presencia en muestras clínicas mediante anticuerpos específicos contra dichas proteínas. También se podría realizar estudios de estructura y función con las proteínas recombinantes purificadas. En este sentido, un reciente trabajo demuestra que la proteína NS1 de parvovirus B19 inyectada en ratones NZB/W F1 provoca un daño hepático debido a un incremento en diversas moléculas relacionadas con la respuesta inmune (Tsai et al., 2013).

En definitiva los objetivos de este TFM abrirán la puerta a diferentes investigaciones para conocer más sobre la biología molecular del HBoV.

5. CONCLUSIONES

- 1) A pesar del pequeño número de muestras estudiadas, se ha encontrado que el bocavirus humano es causante de un 8% de las infecciones respiratorias en niños menores de 14 años.
- 2) Se dispone de los genes codificadores de las proteínas NS1, NP1, UP1 y UP2 de bocavirus humano que serán utilizados en futuros estudios para avanzar en el conocimiento de la biología molecular del bocavirus humano.
- 3) El sistema de expresión heterólogo basado en la producción de proteínas recombinantes con fusión con GST en bacterias *E. coli* BL21(DE3) se ha mostrado idóneo para la producción de las proteína NP1 y UP1 de bocavirus humano.

6. REFERENCIAS

Allander T., Tammi MT., Eriksson M., Bjerkner A., Tiveljung-Lindell A., Andersson, B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2005.** 102:12891-12896.

Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog.* **2009.** 5:e1000391.

Boga JA, Sampere A, Fernández J, Gómez E, Álvarez M, de Oña M, Melón S. Detección de bocavirus y otros virus entéricos en heces de pacientes con gastroenteritis. *Enf Infec y Microb Clin.* **2008;** 26 (Sup. Congreso).

Bönsch C, Kempf C, Ros C. Interaction of parvovirus B19 with human erythrocytes alters virus structure and cell membrane integrity. *J Virol.* **2008.** 82:11784-11791.

Chow BD, Esper FP. The human bocaviruses: a review and discussion of their role in infection. *Clin Lab Med.* **2009.** 29:695-713.

Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J Virol.* **2009.** 83:7739-48.

Harper S, Speicher DW. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol.* **2011.** 681:259-280

Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol.* **2012.** 22:46-64

Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaukat S, Alam MM, Sharif S, Angez M, Zaidi S, Delwart E. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis.* **2009.** 199(2):196-200

Li Q, Zhang Z, Zheng Z, Ke X, Luo H, Hu Q, Wang H. Identification and characterization of complex dual nuclear localization signals in human bocavirus NP1: Identification and characterization of complex dual nuclear localization signals in human bocavirus NP1. *J Gen Virol.* **2013.** 94:1335-1342

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. **1989.**

Murray CJL, Lopez AD, Mathers CD, Stein C. The global burden of disease 2000 project: aims, methods and data sources. In: Global programme on evidence for health policy. Geneva: World Health Organization: **2001.**

Saxena L, Kumar GR, Saxena S, Chaturvedi U, Sahoo AP, Singh LV, Santra L, Palia SK, Desai GS, Tiwari AK. Apoptosis induced by NS1 gene of Canine Parvovirus-2 is caspase dependent and p53 independent. *Virus Res.* **2013.** 173:426-30

Shirkoohi R, Endo R, Ishiguro N, Teramoto S, Kikuta H, Ariga T. Antibodies against structural and nonstructural proteins of human bocavirus in human sera. *Clin Vaccine Immunol.* **2010.** 17:190-193

Sun B, Cai Y, Li Y, Li J, Liu K, Li Y, Yang Y. The nonstructural protein NP1 of human bocavirus 1 induces cell cycle arrest and apoptosis in Hela cells. *Virology.* **2013.** 440:75-83

Tsai CC, Chiu CC, Hsu JD, Hsu HS, Tzang BS, Hsu TC. Human parvovirus B19 NS1 protein aggravates liver injury in NZB/W F1 mice. *PLoS One.* **2013.** 8:e59724

Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis.* **2007.** 13:636-7.

Villa L, Melón S, Suárez S, Álvarez-Argüelles ME, González D, Morilla A, Boga JA, Rodríguez J, de Oña M. Detection of human bocavirus in Asturias, Northern Spain. *Eur Clin Microbiol Infect Dis.* **2008.** 27:237-9.